

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Außenstelle Kleinmachnow

Die Farbstoffbildung von *Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller als Grundlage für eine Schnelldiagnose

The production of colour in *Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller as a basis for a rapid diagnosis

Okka Tschöpe und Edelgard Sachs

Zusammenfassung

Ramularia-Blattflecken sind schwer von anderen Blattflecken, wie den Symptomen der Netzfleckenkrankheit, der Braunfleckigkeit oder nichtparasitären Blattflecken zu unterscheiden. Es wird ein *Ramularia*-Schnelltest vorgestellt, der auf der pH-abhängigen Farbstoffbildung von *Ramularia collo-cygni* beruht. Auf Agar ausgelegte befallene Proben zeigen unter sauren Bedingungen rote Flecken um die *Ramularia*-Nekrosen.

Stichwörter: *Ramularia*-Blattflecken, *Ramularia collo-cygni*, Blattflecken an Gerste, Diagnose-Schnelltest, pH-abhängige Farbstoffbildung

Abstract

Ramularia leaf spots are difficult to distinguish from other leaf spots like the symptoms of net blotch, spot blotch or non parasitic leaf spots. A rapid *Ramularia* diagnosis test is introduced, based on the pH-value dependent colour production of *Ramularia collo-cygni*: Under acid conditions infested samples placed on agar develop red spots around the *Ramularia* necroses.

Key words: *Ramularia* leaf spots, *Ramularia collo-cygni*, barley leaf spotting, rapid diagnosis, pH-value dependent colour production

Einleitung

Die *Ramularia*-Blattfleckenkrankheit oder Sprengelkrankheit (HUSS und NEUHOLD, 1995) der Gerste zeigt als Symptome mittel- bis dunkelbraune Flecken auf Blättern, Grannen und Halmen, die durch Blattadern relativ scharf begrenzt sind. Sie sind ca. 0,8–1,4 mm lang und 0,5–0,7 mm breit (HUSS et al., 1992). Es folgen relativ bald Blattvergilbungen um die nekrotischen Flecken herum, die später das ganze Blatt erfassen und zum vorzeitigen Absterben des Blattes führen.

Erreger der Krankheit ist der imperfekte Pilz *Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller (Syn.: *Ophiocladium hordei*) (HUSS et al., 1987; HUSS, 1995; SUTTON und WALLER, 1988). Seine schwannenhalsartig gebogenen Konidienträger verleihen dem Pilz ein charakteristisches Aussehen. Im Stereo-Mikroskop sind bei 60-facher Vergrößerung zahlreiche aus den Spaltöffnungen herauswachsende Konidienträger als kleine weiße Büschel zu erkennen, die in der Regel erst nach Absterben des befallenen Gewebes auftreten. Der Pilz tötet vermutlich durch ein Toxin (SUTTON und WALLER, 1988) das Wirtsgewebe ab, um sich dann

von den abgestorbenen Gewebeteilen zu ernähren (HUSS und SACHS, 1998). Die Sporen werden durch Wind und Spritzwasser verbreitet.

Die *Ramularia*-Blattfleckenkrankheit kann zu beträchtlichen Ertragsseinbußen führen: Bei stärkerem Befall sind Ausfälle bis zu 10 % zu erwarten, in Teilen des oststeirischen Hügellandes wurde bis zu 20 % Ertragsausfall festgestellt (HUSS et al., 1992). Bekannt ist der Pilz aus Italien (erster Nachweis von CAVARA, 1893), Norwegen (JØRSTAD, 1930) und den USA (HUSS et al., 1987). In den letzten Jahren wurde er verstärkt in weiten Teilen Österreichs, in Deutschland, Schottland, Irland, Tschechien und der Schweiz gefunden (SACHS et al., 1998), wobei er nach HUSS und NEUHOLD (1995) bevorzugt in hügeligen Lagen auftritt. Für Neuseeland berichtet SHERIDAN (2000) von einem *Ramularia*-Befall in epidemischen Ausmaßen. Durch eigene Untersuchungen konnte ein starker Befall neuseeländischer Proben bestätigt werden. In der einschlägigen Fachliteratur über Gerstenkrankheiten findet sich jedoch bislang kein Hinweis auf diese Krankheit.

Ramularia collo-cygni ist leicht mit den Symptomen der Netzfleckenkrankheit (*Drechslera teres*) (HUSS et al., 1987, 1992), der Braunfleckigkeit (*Bipolaris sorokiniana*), mit Hypersensibilitätsreaktionen durch Echten Mehltau (*Blumeria graminis*) sowie mit nichtparasitären Blattflecken zu verwechseln (SACHS et al., 1998). Aus diesem Grund erfordert die Diagnose einen hohen Zeitaufwand, da sich die Ursachen der unterschiedlichen Flecken bisher nur nach 2–3-tägigem Einlegen in die feuchte Kammer an den sich bildenden Konidien und Konidienträgern ermitteln ließen. Das Diagnostizieren zahlreicher Blattproben, wie es für ein Monitoring oder für epidemiologische Arbeiten üblich ist, nimmt mehrere Tage bis Wochen in Anspruch. Eine hinreichend sichere Schnelldiagnose wäre zeitsparend und auch für weniger geübtes Personal nutzbar.

Material und Methoden

Mit zwei unterschiedlichen Isolaten (1Ö und 94/2) infizierte Blätter (3. und 4. Blattetage) der Gerstensorten 'Thuringia' und 'Baccara' wurden auf Wasseragarplatten verschiedener pH-Stufen aus destilliertem Wasser ausgelegt. Das Isolat 1 Ö wurde von ZEDERBAUER Mitte Juli 2000 von der Sommergerste 'Elisa' aus Drauhofen (Österreich) isoliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei dem Isolat 94/2 handelt es sich um eine eigene Isolation von Mitte Juni 2000 der Wintergerstensorte 'Loran' aus Böhmen (Tschechien).

Das Einstellen der pH-Werte erfolgte mittels verdünnter Phosphorsäure bzw. mittels Kaliumhydroxid (5%ig).

Der pH-Wert 7 wurde durch ortstübliches Leitungswasser erreicht.

Die Blätter wurden bei Zimmertemperatur und Zimmerbeleuchtung in Fensternähe inkubiert. Nach etwa 2–3 Tagen waren mit bloßem Auge an den Stellen, an denen die *Ramularia*-Nekrosen auftraten, hell- bis violett-rote Flecken auf den Blättern zu erkennen. Der rote Farbstoff wurde von dem Pilz jedoch nur gebildet, wenn sich die Proben in engem Kontakt zum Agar befanden. Damit zur Befallskontrolle neben der Farbstoffbildung auch die Konidienträger herangezogen werden können, die aus den Stomata vor allem auf der Blattunterseite herauswachsen, wurden die Blätter mit der Blattoberseite auf den Agar gelegt. Zur Bonitur wurde der prozentuale Anteil der rot gefärbten Blattfläche ermittelt.

Ergebnisse

Abbildung 1 stellt die Ergebnisse der Bonitur der roten Blattflecken nach 3 Tagen dar. Es zeigte sich ein deutliches Maximum der Farbstoffbildung bei pH 4. Je basischer das Substrat war, desto geringer war die Tendenz zur Rotfärbung. Bei den sauren

pH-Werten 3 und 3,5 wurde keine Farbstoffbildung mehr beobachtet. Abhängig von Sorte und Isolat trat die Rotfärbung unterschiedlich intensiv auf, wobei jedoch keine Gesetzmäßigkeiten erkannt werden konnten.

In Abbildung 2 ist die Farbstoffbildung in Abhängigkeit von Sorte, Isolat und Blatttage dargestellt.

Nach 7-tägiger Inkubation war auch bei den basischen pH-Werten eine Rotfärbung zu beobachten (Abb. 3).

Mittelt man jedoch die rotgefärbte Fläche aller Blätter bei den jeweiligen pH-Werten, so ist auch nach 7 Tagen noch die stärkste Verfärbung bei einem pH-Wert von 4 festzustellen (Abb. 4).

Die Abbildung 5 zeigt die entstehende leichte Rotfärbung um die *Ramularia*-Flecken bei einem pH-Wert von 4.

In weiteren Versuchen – hier nicht dargestellt – zeigte sich auch eine Rotfärbung um die *Ramularia*-Blattflecken, wenn die *Ramularia*-befallenen Blätter auf einen Wasseragar gelegt wurden, der ohne zusätzliche pH-Wert-Einstellung nur mit destilliertem Wasser bereitet wurde. Dieser Agar wies einen pH-Wert von 4,9 auf. Diese Rotfärbung war nicht so intensiv wie bei pH 4, reichte jedoch als Diagnosehilfe.

Abb. 1. Rote Blattflecken auf Gerstenblättern der Sorte 'Thuringia' und 'Baccara', inokuliert mit den Isolaten 94/2 bzw. 1Ö nach dreitägiger Inkubation.

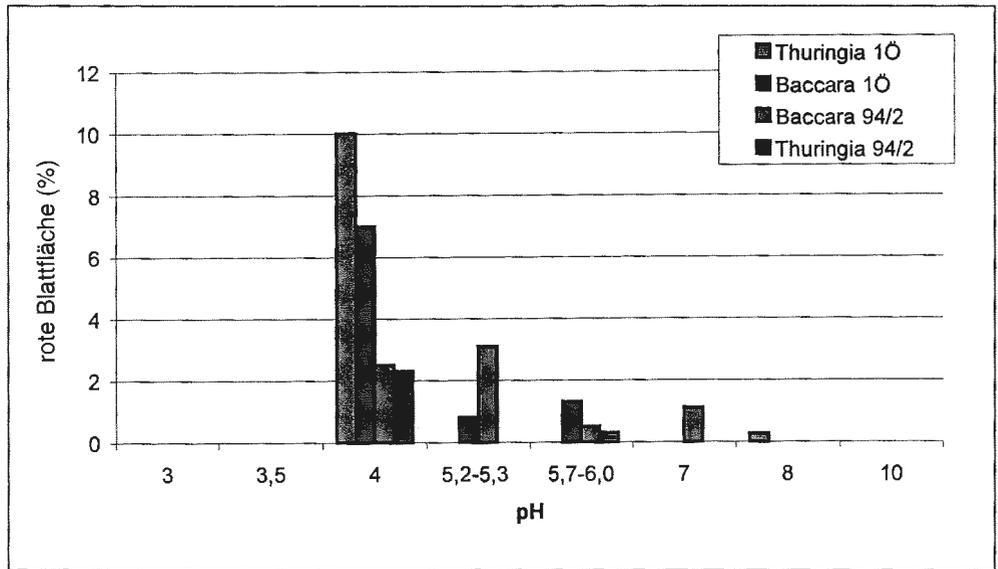
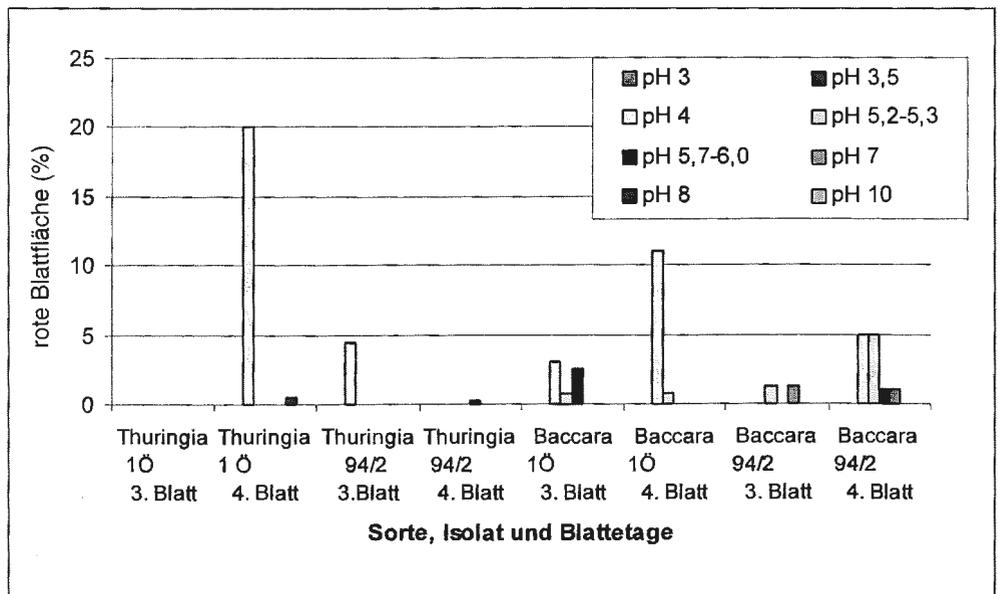


Abb. 2. Farbstoffbildung bei unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit von der Gerstensorte, dem Isolat und der Blatttage.



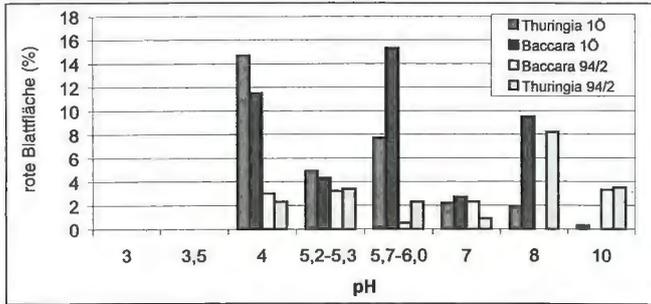


Abb. 3. Rote Blattflecken auf Gerstenblättern der Sorte 'Thuringia' und 'Baccara', inokuliert mit den Isolaten 94/2 bzw. 10 nach siebentägiger Inkubation.

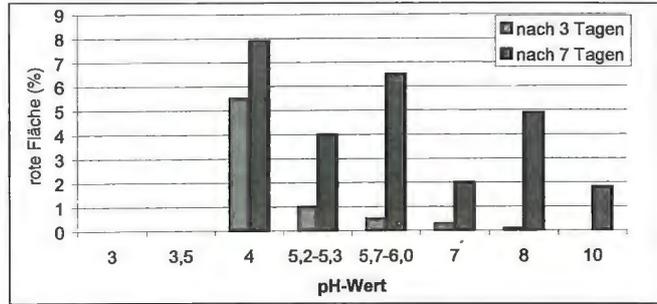


Abb. 4. Vergleich der Farbstoffbildung nach 3 und 7 Tagen.

Diskussion

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Farbstoffbildung von *Ramularia collo-cygni* auf Wasseragar pH-abhängig ist. Hierbei erwies sich ein pH von 4 als optimal, wie die nach 3 Tagen bonitierten Blätter zeigen. Auch ein pH-Wert von 4,9, wie er durch die Verwendung von destilliertem Wasser erreicht wurde, bewirkte eine für die Diagnose noch ausreichende Wirkung. Offensichtlich ist für die Biosynthese des Farbstoffes ein saures Milieu erforderlich. Die Tatsache, dass der Farbstoff nur bei engem Kontakt der Proben zum Agar gebildet wird, spricht hierbei ebenfalls für eine pH-Abhängigkeit. Befallsstellen des Blattes, die durch Drehung der Blattachse keinen Kontakt zum sauren Agar aufweisen, bilden auch keinen roten Farbstoff. Die bessere Durchfeuchtung der aufliegenden Proben könnte dabei ebenfalls eine Rolle spielen. Bei der Durchführung von Routine-tests ist es deshalb für die Diagnose notwendig, bei nicht dem Agar anliegenden Probestellen besonders auf die auswachsenden Konidienträger zu achten, da an diesen Stellen die Rotfärbung unterbleibt. Die vermehrte Farbstoffbildung nach 7 Tagen auch bei basischeren pH-Werten ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich mit zunehmender Seneszenz der Säuregrad in den Blättern verändert.

Blattflecken, die andere Ursachen haben, wie nichtparasitäre Blattflecken, *Drechslera teres*, *Bipolaris sorokiniana* oder

Ascochyta hordei, verursachen keine Rotfärbung des umgebenden Gewebes. Nur in ganz seltenen Ausnahmefällen waren Netzflecken, verursacht durch *D. teres*, leicht violett gefärbt. Eine Verwechslung mit der Rotfärbung durch *R. collo-cygni* kann sicher durch die typischen *Drechslera*-Konidienträger mit Konidien ausgeschlossen werden, die die zehnfache Größe von *Ramularia*-Konidienträgern mit deren Konidien aufweisen.

Schlussfolgerung

Zur schnellen Diagnose von *Ramularia collo-cygni*-Befall auf Gerstenblättern eignet sich eine Farbreaktion des Pilzes, wenn die fraglichen Blätter auf Wasseragar gelegt werden, der mit destilliertem Wasser hergestellt wurde. Nach 2–3-tägiger Inkubation bildet sich um die *Ramularia*-Blattflecken ein roter Hof, wodurch diese sehr schnell erkannt werden und nicht mit ähnlichen anderen Blattflecken zu verwechseln sind.

Danksagung

Der technischen Assistentin Frau I. TESSENOW sei für die Isolation des Pilzes und ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen herzlich gedankt.



Abb. 5. Mit *R. collo-cygni* befallene Gerstenblätter auf Wasseragar mit einem pH-Wert von 4 liegend. Die braunen *Ramularia*-Blattflecken sind von einem roten Hof umgeben.

Literatur

- CAVARA, F., 1893: Über einige parasitische Pilze auf dem Getreide. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten **3**, 16–26.
- HUSS, H., H. MAYRHOFER, H. WETSCHING, 1987: *Ophiocladium hordei* CAV. (Fungi imperfecti), ein für Österreich neuer parasitischer Pilz der Gerste. Der Pflanzenarzt **7–8**, 11–13.
- HUSS, H., H. MAYRHOFER, E. INGOLIC, 1992: *Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller (Fungi imperfecti), ein wirtschaftlich bedeutender Parasit der Gerste in der Steiermark. Mitt. Naturwiss. Ver. Steiermark, **122**, 87–95.
- HUSS, H., G. NEUHOLD, 1995: *Ramularia collo-cygni* (Fungi imperfecti) – Der Erreger der Sprenkelkrankheit der Gerste. – Berichte der Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtler im Rahmen der Vereinigung österr. Pflanzenzüchter in Gumpenstein, 197–199.
- HUSS, H., E. SACHS, 1998: *Ramularia*-Blattflecken- oder Sprenkelkrankheit der Gerste. Der Pflanzenarzt, **11–12**, 15–18.
- JØRSTAD, I., 1930: Beretning om plantesykdommer i land – og hagebruket. VI Sykdommer på korn – og engvekster. 84pp. Oslo.
- SACHS, E., D. AMELUNG, K. KLAPPACH, 1998: Die Symptome der Netzfleckenkrankheit der Gerste, hervorgerufen durch *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem., und deren Verwechslungsmöglichkeiten. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **50** (3), 58–63.
- SACHS, E., P. GREIF, D. AMELUNG, H. HUSS, 1998: *Ramularia collo-cygni*, ein wiederentdeckter Gerstenpathogen in Europa. – Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft., **357**, 96–97.
- SHERIDAN, J. E., 2000: Cereal Diseases 1999–2000 (Including pea diseases and gooseberry mildew) – Disease Survey and disease control in the Wairarapa, New Zealand, Plant Doctors Ltd. **37**, 1–38.
- SUTTON, B. C., J. M. WALLER, 1988: Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. – Trans. Br. Mycol. Soc. **90**, 55–61.

Zur Veröffentlichung angenommen: 2. Januar 2001

Kontaktanschrift: Dr. Edelgard Sachs, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Außenstelle Kleinmachnow, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow.